

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

03.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

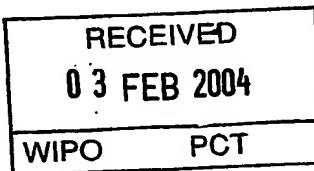
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年12月 1日

出願番号
Application Number: 特願 2003-401940

[ST. 10/C]: [JP 2003-401940]

出願人
Applicant(s): 株式会社分子生理化学研究所
株式会社資生堂



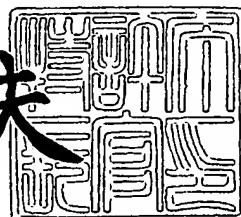
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2004年 1月 16日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 SI2003-244
【提出日】 平成15年12月 1日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 G01N 30/02
C07C 50/28

【発明者】

【住所又は居所】 東京都杉並区本天沼3-34-38-107
【氏名】 山本 順寛

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区銀座7-5-5 株式会社資生堂内
【氏名】 三田 真史

【特許出願人】

【識別番号】 502437827
【氏名又は名称】 株式会社分子生理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000001959
【氏名又は名称】 株式会社資生堂

【代理人】

【識別番号】 100070150
【弁理士】

【氏名又は名称】 伊東 忠彦

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-351677
【出願日】 平成14年12月 3日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002989
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0114941

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

検体に含まれるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を定量する、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法において、

前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

【請求項2】

前記水溶性有機溶媒がイソプロピルアルコールであることを特徴とする請求項1記載のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

【請求項3】

前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の範囲内の温度で保管しておくことを特徴とする請求項1または2記載のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

【請求項4】

前記分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うことを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項に記載のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

【請求項5】

前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出することを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項に記載のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法。

【請求項6】

請求項5記載のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法に用いる分析システムであって、

分析試料を第1の移動相とともに送液する第1系列と第2の移動相のみを送液する第2系列とからなる送液機構と、

該送液機構の2つの系列の移動相の送液経路を切り換える切り換え機構と、

該第1系列の移動相を受け入れて該分析試料を濃縮した後、該第2の移動相を受け入れる濃縮カラムと、

該濃縮カラムから送り出される液を受け入れて分離する分離カラムと、

該分離カラムから送り出された液を受け入れて還元する還元カラムと、

該還元カラムから送り出された液を検出処理する電気化学検出器とを有することを特徴とするコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システム。

【請求項7】

検出器としてさらに紫外吸収検出器を有することを特徴とする請求項6記載のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システム。

【書類名】明細書

【発明の名称】コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システム

【技術分野】

【0001】

本発明は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムに関する。

【背景技術】

【0002】

コエンザイムQ（補酵素Q：C₀Q）はベンゾキノン誘導体であり、広く生物界に存在することからユビキノンと命名されている。ユビキノンを2電子還元したヒドロキノン体がユビキノールである。

【0003】

ユビキノンは、化合物名が2,3-シ^oメトキシ-5-メチル-6-ホ^oリフ^oレニル-1,4-ヘ^oンゾ^oキノンであり、イソフ^oレン単位がn=1~12の多数の同族体が天然に存在し、ヒト等の高等動物についてはn=10である。以下の説明では、特に断らない限り、ヒト等のユビキノンについてコエンザイムQ-10と表示するとともに、ヒト等のユビキノールについてコエンザイムQ-10の2電子還元体と表示する。

【0004】

コエンザイムQ-10の2電子還元体は、強い抗酸化作用があり、活性酸素による細胞の損傷を防ぐ等老化防止に効果があるといわれている。

【0005】

酸化ストレスは、生体内の酸化と抗酸化のバランスが崩れて酸化に傾いた、生体にとって好ましくない状態とされているが、コエンザイムQ-10とその2電子還元体の比率は、この酸化ストレスの度合いを反映していると考えられるので、酸化ストレスの良好なマーカーになりうるものと考えられている。

【0006】

このように、コエンザイムQ-10とその2電子還元体の挙動を知ることは非常に有用であるため、これらの成分を的確に分析する方法が求められる。

【0007】

分析方法として、古典的なものとして紫外吸収法等があるが、第三物質の影響を受けやすく、煩雑な前処理を要する。

【0008】

近年では、高感度で正確に分析できる方法として高速液体クロマトグラフィ（以下、HPLCと表示する。）が広く用いられている。コエンザイムQ-10の検出には275nmの紫外吸収が利用されている。しかしながら、従来のHPLCによる分析方法は、血漿中のコエンザイムQ-10を検出するためには感度が不十分である。

【0009】

このため、コエンザイムQ-10を2電子還元体に還元して、還元前後の差をコエンザイムQ-10として定量する方法も提案されている。ところが、この分析方法では、検体の前処理を行うとともに、HPLCへの試料注入を2度行う必要がある。

【0010】

このため、本出願人は、図1に示すように、逆相の分離カラム（スペルコ社製LC-81）でコエンザイムQ-10とその2電子還元体を分離した後、還元カラム（資生堂製SHISEIDO CQ）2あるいはクロメトリック電極を用いてコエンザイムQ-10を2電子還元体に還元して電気化学検出器3で測定する方法を、先に提案している（例えば、非特許文献1参照。）。なお、図1中、参照符号4は移動相を、参照符号5はポンプを、参照符号6は試料注入器を、参照符号7は保護カラムを、参照符号8は紫外吸収検出器を、それぞれ示す。

【0011】

上記の分析方法を用いることにより、コエンザイムQ-10とその2電子還元体の高感度同時測定が可能である。得られるクロマトグラムの一例を図2に示す。図2中、「1」がコエンザイムQ-10のピークであり、「2」がコエンザイムQ-10の2電子還元体のピークである。

【0012】

この場合、検体中の例えはビタミンCや尿酸等の水溶性抗酸化物質が測定に影響するところから、検体をメタノール/ヘキサンで抽出処理し、水溶性抗酸化物質をメタノール相に、コエンザイムQ-10等をヘキサン相に分配する前処理を行っている。

【非特許文献1】 Satosi Yamasita and Yorihiro Yamamoto ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 250, 66-73 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

しかしながら、上記のメタノール/ヘキサンで抽出処理する前処理方法は、ヘキサン抽出液中のコエンザイムQ-10が化学的に不安定であり、前処理後、処理液をHPLCに注入して分析するまでの間において、図3に示すように、かなりの率でコエンザイムQ-10の2電子還元体が酸化されてしまうために、検体抽出後、速やかに分析することが必要であった。正確な分析を行うためには、HPLCに注入する直前に抽出操作を行うことが必須であるため、大量の検体を一括して処理することが極めて困難であった。なお、図3中、各温度はヘキサン抽出液の保管温度を示す。

【0014】

本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、検体中のコエンザイムQ-10とその2電子還元体の含有量を正確に定量することができる分析方法ならびに分析システムを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

上記の課題を解決するために本出願人が鋭意検討した結果、前処理に用いる抽出溶剤としてメタノール/ヘキサンに変えてイソプロピルアルコールを用いることがより好適であることを見出し、この知見に基づいて以下の発明に至った。

【0016】

本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法は、前処理として該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む該検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析することを特徴とする。

【0017】

ここで、コエンザイムQ-10がユビキノンを指し、コエンザイムQ-10の2電子還元体がユビキノールを指すことは前記のとおりである。水溶性有機溶媒は、イソプロピルアルコールが好適であるが、これに限らず、イソプロピルアルコールと同等の極性を有する溶媒を用いることができ、例えは、メタノール、エタノール、ブタノールおよびn-ブロピルアルコールを混合して極性を調整した混合溶媒等を用いることができる。なお、前処理後の分析試料を分析する方法は、以下に説明する本発明の分析方法に限らず、前記した従来の分析方法等、適宜の方法を採用することもできる。

【0018】

本発明の上記の構成により、分析試料の分析までの間の成分の変化を抑制することで正確に分析することができる。また、検体を抽出した後に直ちに分析を行う必要がない。

【0019】

この場合、前記抽出液を分析するまでの間、該抽出液を該抽出液の融点乃至室温の範囲内の温度、より好ましくは4℃前後の温度で保管しておくと、成分の変化をより確実に抑制することができて好適である。ここで、抽出液の融点は、抽出に用いる水溶性有機溶剤の融点と実質的に同じである。

【0020】

また、この場合、前記分析試料（抽出液）をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うと、分析試料のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の濃度が低い場合においても正確にかつ高感度で分析することができて、好適である。

【0021】

また、この場合、前記コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、該コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出すると、従来のようにHPLCに分析試料を2度注入する必要がなく、能率的に分析することができて好適である。

【0022】

また、上記本発明の分析方法を好適に実現するために、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムは、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法に用いる分析システムであって、分析試料を第1の移動相とともに送液する第1系列と第2の移動相のみを送液する第2系列とからなる送液機構と、該送液機構の2つの系列の移動相の送液経路を切り換える切り換え機構と、該第1系列の移動相を受け入れて該分析試料を濃縮した後、該第2の移動相を受け入れる濃縮カラムと、該濃縮カラムから送り出される液を受け入れて分離する分離カラムと、該分離カラムから送り出された液を受け入れて還元する還元カラムと、該還元カラムから送り出された液を検出処理する電気化学検出器とを有することを特徴とする。

【0023】

この場合、検出器としてさらに紫外吸収検出器を有すると、検体中のコレステロール等の電気化学検出では高感度で検出できない成分を同時分析することができて、好適である。

【発明の効果】

【0024】

本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法によれば、前処理としてコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の少なくともいずれかひとつを含む検体を水溶性有機溶媒で抽出し、抽出液を分析試料として分析するため、正確に分析することができる。また、検体を採取した後に直ちに分析を行う必要がない。

【0025】

また、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法によれば、分析試料をカラムスイッチング法により濃縮する予備処理を行うため、分析試料のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の濃度が低い場合においても正確にかつ高感度で分析することができる。

【0026】

また、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法によれば、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の双方を含む検体からの抽出液を分析試料とし、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をカラム分離し、さらに還元処理した後、検出器により検出するため、能率的に分析することができる。

【0027】

また、本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムによれば、分析試料を第1の移動相とともに送液する第1系列と第2の移動相のみを送液する第2系列とからなる送液機構と、送液機構の2つの系列の移動相の送液経路を切り換える切り換え機構と、第1系列の移動相を受け入れて分析試料を濃縮した後、第2の移動相を受け入れる濃縮カラムと、濃縮カラムから送り出される液を受け入れて分離する分離カラムと、分離カラムから送り出された液を受け入れて還元する還元カラムと、還元カラムから送り出された液を検出処理する電気化学検出器とを有するため、好適に本発明の分析方法を実現することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析シ

ステムの好適な実施の形態（以下、形態例という。）について、図を参照して、以下に説明する。

【0029】

以下説明する第1の形態例においては、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を含む検体としてヒトの血漿を用いる。また、第2の形態例においては、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を含む検体としてヒトの唾液を用いる。

【0030】

まず、第1の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法における前処理について、図4を参照して説明する。

【0031】

検体としてのヒトの血漿を50μl採取し（図4中、S-1）、これにイソプロピルアルコールを950μl加え（図4中、S-2）、十分に混合させる。ついで、4℃の温度下、12000rpmの回転速度で3分間、遠心機にかける。これにより、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体がイソプロピルアルコール相に抽出される（図4中S-3）。

【0032】

そして、コエンザイムQ-10等を抽出した抽出液は、4℃前後の温度で保管することにより（図4中、S-4）、図5に示すように、少なくとも11時間後においてもコエンザイムQ-10の2電子還元体が殆ど酸化を受けておらず、保管中の分析試料の変質を防止することができる。なお、図5（b）中、縦軸のコエンザイムQ-10は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の総量に占めるコエンザイムQ-10の比率（モル比）を表す。

【0033】

以上説明した本実施に係る第1の形態例の前処理方法によれば、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を抽出した分析試料を長時間安定した状態で保管することができる。そして、この抽出液を分析試料として、正確に分析することができる。また、このため、例えば、4℃に温度を制御したオートサンプラーに抽出液を分析試料としてセットすることで、大量の検体を連続自動処理することができる。

【0034】

なお、4℃という温度は、生体試料を検体とするときの通常の取り扱い温度であり、この温度に生体試料を保つことにより、他の成分の変質も避けることができる。この温度を大きく超える温度で生体試料を取り扱うと、コエンザイムQ-10の2電子還元体をはじめとする成分の変質を避けることができず、一方、生体試料を冷凍保管すると、分析に際して生体試料を解凍する手順が必要となり、また、上記したオートサンプラー等を用いた連続自動処理を容易に実現することができない。

【0035】

したがって、本発明で言う4℃前後という温度は、上記した生体試料の取り扱いを可能とする限り、4℃よりも高い温度および4℃よりも低い温度の両方を含む意である。すなわち、抽出液の保管温度は、抽出用の水溶性有機溶媒の融点乃至常温の範囲であってもよい。第1の形態例においては、抽出用の水溶性有機溶媒としてイソプロピルアルコールを用いるため、保管温度の下限値は、イソプロピルアルコールの融点である-89.5℃ということになる。

【0036】

つぎに、上記の前処理を施し、所要時間保管した抽出液を分析試料として、HPLCで分析する方法について、以下説明する。

【0037】

まず、図6を参照して、本実施に係る分析方法に用いる分析システムについて説明する。本実施に係る分析システム10は、送液機構12と、切り換え機構14と、濃縮カラム16と、分離カラム18と、還元カラム20と、電気化学検出器22と、紫外吸収検出器24とを備える。

【0038】

送液機構12は、第1および第2の2系列で構成され、各系列は、それぞれ、移動相の貯留容器25a、25bと、貯留容器25a、25bの移動相を送液するポンプ26a、26bとを備える。第1系列には、試料注入器28をさらに備える。

【0039】

第1系列の貯留容器25aには、移動相として、過塩素酸ナトリウム50mMを含むメタノールと水の混合溶液（メタノール95%水溶液）を貯留する。一方、第2系列の貯留容器25bには、移動相として、過塩素酸ナトリウム50mMを含むメタノールとイソプロピルアルコールの混合溶液（メタノール90%溶液）を貯留する。

【0040】

ポンプ26a、26bは、例えば、いずれも、資生堂製のイナートポンプ3001を用いることができる。このイナートポンプ3001は、パルスモータによる定流量、定圧方式のデュアルピストンポンプであり、流量が $1\sim3000\mu\text{l}/\text{min}$ 、吐出上限圧力35MPaである。

【0041】

第1系列に設けられる試料注入器28は、第1系列の移動相に分析試料を同伴させるためのものであり、適宜の装置を用いることができるが、好適にはオートサンプラーを用いる。

【0042】

試料注入器28としてオートサンプラーを用いる場合、例えば資生堂製のオートサンプラー3023を用いることができる。オートサンプラー3023は、試料注入量 $0.1\sim400\mu\text{l}$ （ $0.1\mu\text{l}$ 単位で制御可能）、試料処理数100～200本であり、電子冷却により $4\sim20^\circ\text{C}$ の範囲内で温度を制御できる。

【0043】

切り換え機構14は、送液機構12の2つの系列の移動相の送液経路を切り換えるためのものである。図6中、矢印A1のモード（以下モードA1という。）において、第1系列の移動相が濃縮カラム16に送られ、濃縮カラム16を出た、コエンザイムQ-10等を取り除かれた液が排出される。

【0044】

一方、第2系列の移動相が濃縮カラム16をバイパスして分離カラム18に直接送られる。これに対して、矢印A2のモード（以下、モードA2という。）において、第1系列の移動相が系外に排出されて濃縮カラム16への送液が停止するとともに、第2系列の移動相が濃縮カラム16に送られ、濃縮された分析試料を同伴した液（第2の移動相を主体とする液）が濃縮カラム16から分離カラム18に送られる。これにより、濃縮された分析試料が第2系列の移動相に同伴して分離カラム18に送られる。

【0045】

切り換え機構14は、例えば切り換えバルブで構成され、このような切り換えバルブとしては、例えば、資生堂製の高圧切換六方バルブ3011を用いることができる。高圧切換六方バルブ3011は、SUS6ポート2ポジションバルブであり、耐圧が35MPaである。なお、この切り換え機構14で用いられる配管類をはじめとして分析システム10で用いられる配管類の接続関係は図6より明らかであり、また、配管材料については、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の吸着を防ぐために、SUSを用いる。

【0046】

濃縮カラム16は、既に説明したように、例えば充填剤の吸着作用等を用いて分析試料を濃縮するためのものであり、例えばスペルコ社製のLC-8を用いることができる。

【0047】

分離カラム18は、濃縮カラム16から送り出された液を分離するためのものであり、例えばスペルコ社製のLC-8を用いることができる。

【0048】

還元カラム20は、分離カラムから送り出された液を還元するためのものであり、具体

的には、分析試料中のコエンザイムQ-10をその2電子還元体に変換することを目的としたカラムである。還元カラム20は、例えば、資生堂製SHISEIDO CQを用いることができる。

【0049】

電気化学検出器22は、電気化学的に高感度で検出することができるコエンザイムQ-10の2電子還元体を分析することを目的とするものであり、例えば資生堂製の電気化学検出器3005を用いることができる。電気化学検出器3005は、三極ポテンシオスタット方式であり、±1990mVの範囲内で10mV単位で加電圧をデジタル設定することができる。

【0050】

紫外吸収検出器24は、分析試料である血漿に含まれるコレステロール等の紫外線の吸収感度が高い成分を必要に応じて分析するためのものである。紫外吸収検出器22は、例えば、資生堂製のUV-VIS検出器3002を用いることができる。UV-VIS検出器3002は、ダブルビームシングルセル方式であり、波長範囲が195~700nmである。

【0051】

以上説明した本実施に係る分析システム10を用いた第1の形態例に係る分析方法を、つぎに説明する。

【0052】

前記した前処理後の抽出液を分析試料として40μl用意する。この40μlの分析試料中には、2.0μlのヒトの血漿が含まれる。

【0053】

まず、切り換え機構14をモードA2にして、貯留容器25bに貯留した第2系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16、分離カラム18および還元カラム20の各カラムに流して、各カラムを安定化させる。このとき、必要に応じて分離カラム18および還元カラム20へは、モードA1で送液してもよい。

【0054】

このカラムの安定化操作は、基本的に1度行えばよく、その後、複数の分析試料を順次分析する場合においてもその都度上記の安定化操作を繰り返す必要はない。但し、カラム14の切り換え前後を通じて第2系列の移動相を定常的に各カラムに送ってもよい。

【0055】

ついで、貯留容器25aに貯留した第1系列の移動相（メタノール95%水溶液）をポンプ26aで、途中で試料注入器28によって上記の分析試料を同伴させて濃縮カラム16に送液する。このときの流速は400μl/minであり、ポンプ吐出圧は1MPaである。濃縮カラム16では分析試料中のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体等の主要な成分が保持される。残余の液は、系外に排出する。

【0056】

ついで、上記の主要な成分が保持された濃縮カラム16に、貯留容器25bに貯留した第2系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16に送液する。このときの流速は800μl/minであり、ポンプ吐出圧は10.1MPaである。

【0057】

なお、これらの操作は、前記したように切り換え機構14を介して行われる。

【0058】

ここで、試料注入器28としてオートサンプラーを用いて、4℃の温度に保持された分析試料を連続的に自動処理するときは、分離カラム18以降のカラムには、濃縮された分析試料を送らない間、切り換え機構14を介して第2系列の移動相を常時送液しておくと、より好適である。このときの流速は800μl/minであり、ポンプ吐出圧は7.6MPaである。

【0059】

これにより、主要な成分が濃縮された分析試料を同伴した液が、分離カラム18、還元カラム20に順次送液され、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を主体（分析対象成分）とする分析試料中の主要な成分の分離が行われ、さらに、コエンザイムQ-10を主とする被還元性成分が還元される。

【0060】

還元カラム20で処理された液は、電気化学検出器22および紫外吸収検出器24に順次送られ、検出処理される。

【0061】

電気化学検出器22により得られる、検体としてヒトの血漿を用いたクロマトグラムの一例を図7に示す。電気化学検出器22の設定加電圧は600mVである。図7中矢印1aがコエンザイムQ-10の2電子還元体（ユビキノール）のピークを示し、矢印2aがコエンザイムQ-10（ユビキノン）のピークを示す。

【0062】

続いて、第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法における前処理について説明する。前記した第1の形態例とは、検体が異なる（第1の形態例ではヒトの血漿）だけであるため、第1の形態例の説明と同様に図4を用いて説明する。

【0063】

まず、検体としてのヒトの唾液を40μl採取し（図4中、S-1）、これにイソプロピルアルコールを950μl加え（図4中、S-2）、十分に混合させる。ついで、4℃の温度下、12000rpmの回転速度で3分間、遠心機にかける。これにより、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体がイソプロピルアルコール相に抽出される（図4中S-3）。

【0064】

そして、コエンザイムQ-10等を抽出した抽出液は、4℃前後の温度で保管される（図4中、S-4）。本第2の形態例においても、第1の形態例と同様に、保管中の分析試料の変質を防止することができる。よって、本実施に係る第2の形態例によても、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を抽出した分析試料を長時間安定した状態で保管することができる。そして、この抽出液を分析試料として、正確に分析することができる。なお、他の条件等については、先に説明した第1の形態例と同一であるため、その説明は省略する。

【0065】

つぎに、上記の前処理を施し、所要時間保管した抽出液を分析試料として、HPLCで分析する方法について以下説明する。本実施に係る第2の形態例における分析方法も、基本的に前記した第1の形態例における分析方法と同一である。このため、第2の形態例における分析方法については簡略的に説明するものとする。なお、分析に使用するHPLC及び分析システムは、先に図6を用いて説明したものをそのまま使用するため、HPLC及び分析システムの説明は省略するものとする。

【0066】

前記した前処理後の抽出液を分析試料として40μl用意する。この40μlの分析試料中には、2.0μlのヒトの唾液が含まれる。

【0067】

まず、切り換え機構14をモードA2にして、貯留容器25bに貯留した第2系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16、分離カラム18および還元カラム20の各カラムに流して、各カラムを安定化させる。この際、濃縮カラム16としては直径2.0mm×長さ35mmであるCapcel Pack C18 AQ S5（商品名）を用いることができる。また、分離カラム18としては直径2.0mm×長さ250mmであるCapcel Pack C18 AQ S5（商品名）を用いることができる。さらに、還元カラム20としては直径2.0mm×長さ20mmであるSHISEIDO CQ（商品名）を用いることができる。

【0068】

ついで、貯留容器25aに貯留した第1系列の移動相（メタノール95%水溶液）をポンプ26aで、途中で試料注入器28によって上記の分析試料を同伴させて濃縮カラム16に送液する。この時の流速は、例えば $200\mu\text{l}/\text{min}$ である。この濃縮カラム16では分析試料中のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体等の主要な成分が保持される。残余の液は、系外に排出する。

【0069】

ついで、上記の主要な成分が保持された濃縮カラム16に、貯留容器25bに貯留した第2系列の移動相（メタノール90%溶液）をポンプ26bで濃縮カラム16に送液する。ここで、試料注入器28としてオートサンプラーを用いて、4℃の温度に保持された分析試料を連続的に分離カラム18に供給する。

【0070】

これにより、主要な成分が濃縮された分析試料を同伴した液が、分離カラム18、還元カラム20に順次送液され、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を主体（分析対象成分）とする分析試料中の主要な成分の分離が行われ、さらに、コエンザイムQ-10を主とする被還元性成分が還元される。この時の流速は、例えば $400\mu\text{l}/\text{min}$ である。還元カラム20で処理された液は、電気化学検出器22および紫外吸収検出器24に順次送られ、検出処理される。

【0071】

電気化学検出器22により得られる、検体としてヒトの唾液を用いたクロマトグラムの一例を図8に示す。図8中、矢印3aがコエンザイムQ-10のピークを示している。

【0072】

以上説明した第1及び第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムによれば、検体からコエンザイムQ-10およびその2電子還元体を抽出した抽出液を分析試料とし、この分析試料を濃縮したものを分析するため、高感度で正確に分析することができる。

【0073】

また、第1及び第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムによれば、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体を同時分析し、また、好ましくは大量の検体を連続的かつ自動的に処理するため、能率的に分析することができる。

【0074】

さらに、第2の形態例に係るコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法ならびに分析システムによれば、検体として唾液を用いてる。唾液の採取は血液（血漿）の採取と異なり非侵襲であるため、自己採取可能であり、体内におけるコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の量を容易に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】図1は、従来のコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムの概略構成を示す図である。

【図2】図2は、図1の分析システムで得られるクロマトグラムの一例である。

【図3】図3は、図1の分析システムの供試試料を保管したときの成分の経時変化を示すグラフ図であり、図3(a)はコエンザイムQ-10の2電子還元体についてのものであり、図3(b)はコエンザイムQ-10についてのものである。

【図4】図4は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析方法における前処理工程を説明するための図である。

【図5】図5は、前処理後の抽出液を保管するときの成分の経時変化を示すグラフ図であり、図5(a)はコエンザイムQ-10およびその2電子還元体の量について、図5(b)はコエンザイムQ-10のモル分率についてのものである。

【図6】図6は、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体の分析システムの概略構成を示す図である。

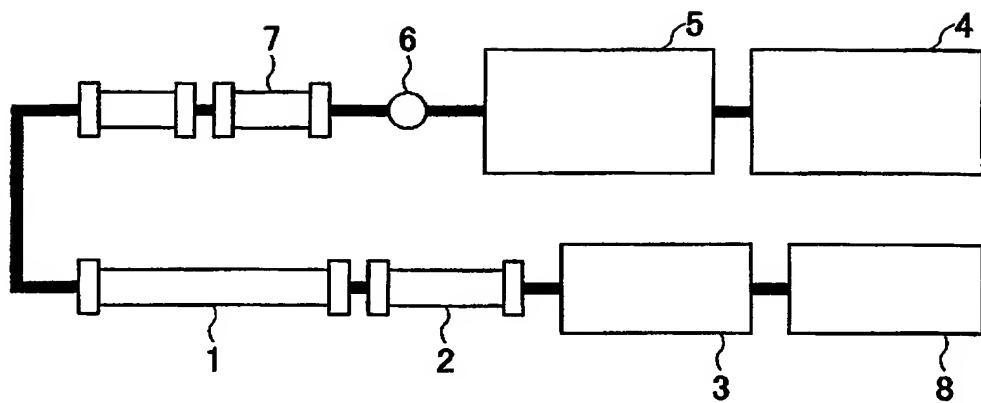
【図7】図7は、検体として血漿を用いた場合において、図6の分析システムで得られるクロマトグラムの一例である。

【図8】図8は、検体として唾液を用いた場合において、図6の分析システムで得られるクロマトグラムの一例である。

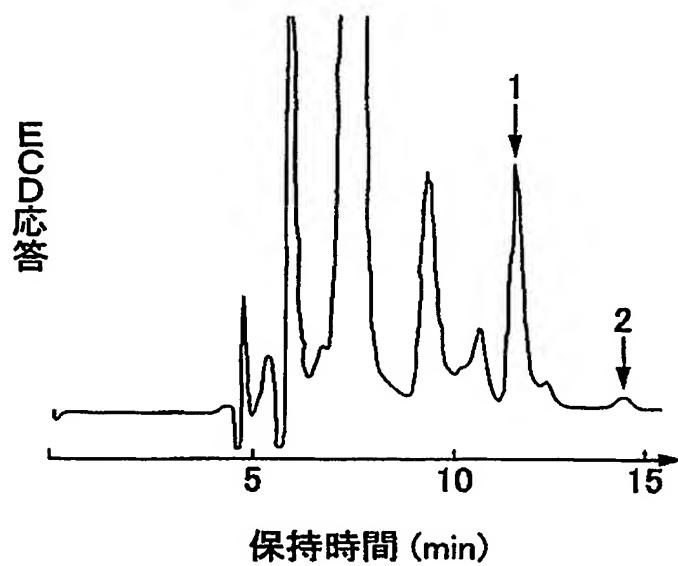
【符号の説明】

【0076】

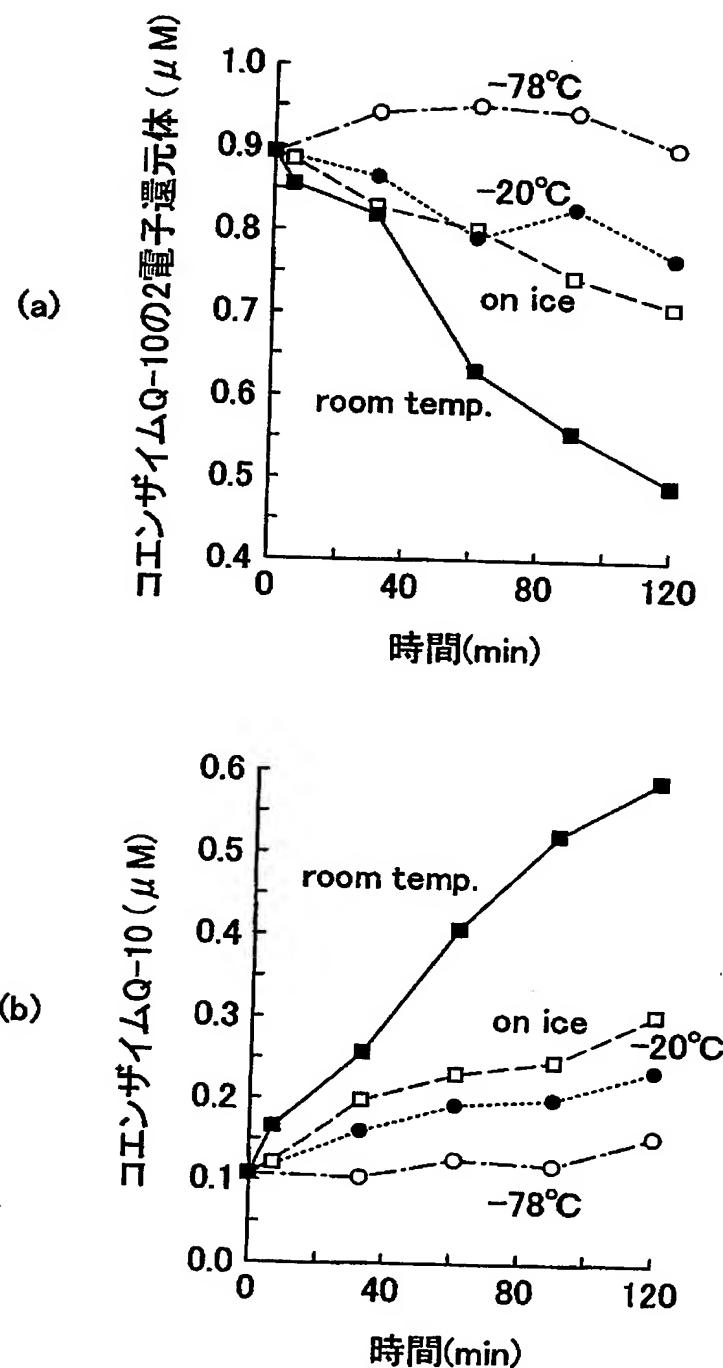
- 10 分析システム
- 12 送液機構
- 14 切り換え機構
- 16 濃縮カラム
- 18 分離カラム
- 20 還元カラム
- 22 電気化学検出器
- 24 紫外吸収検出器
- 25 a、25 b 貯留容器
- 26 a、26 b ポンプ
- 28 試料注入器

【書類名】 図面
【図 1】

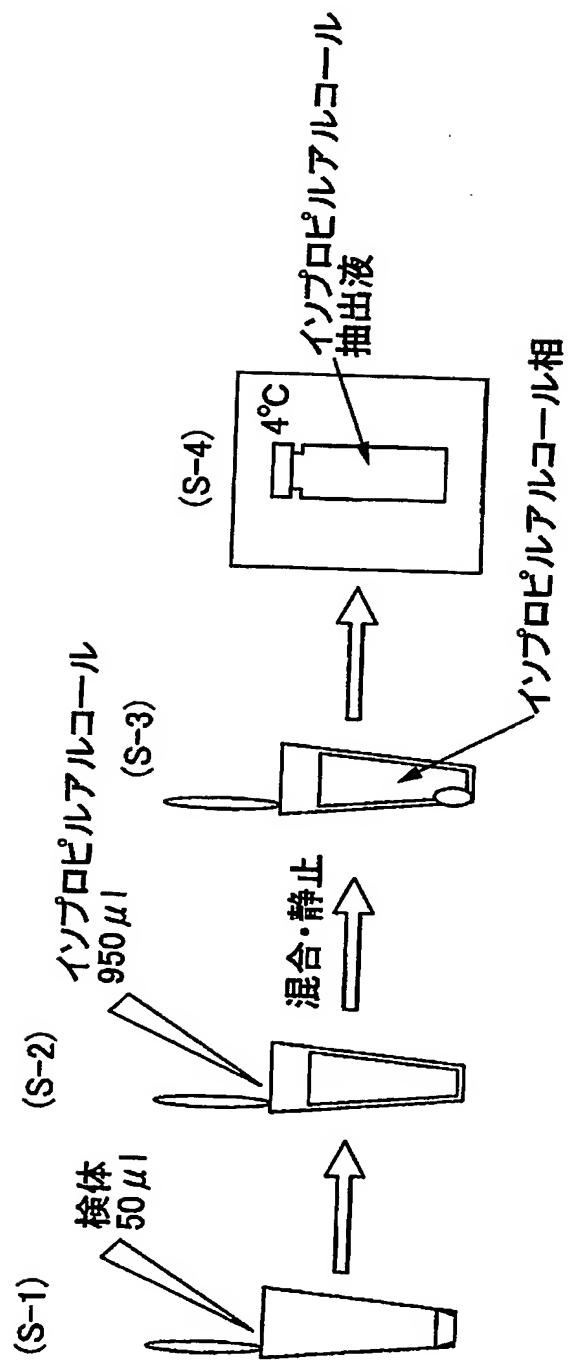
【図 2】



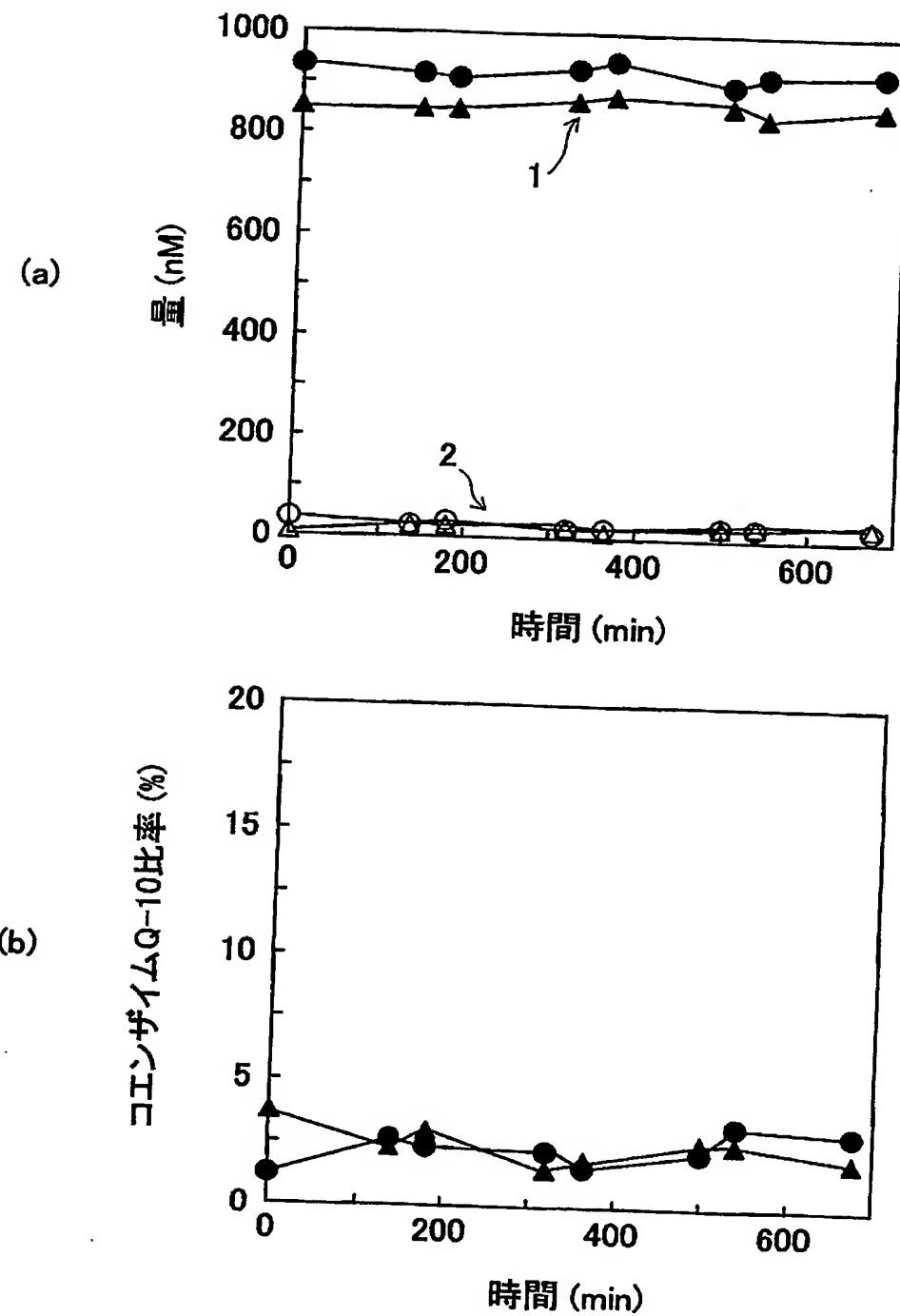
【図3】



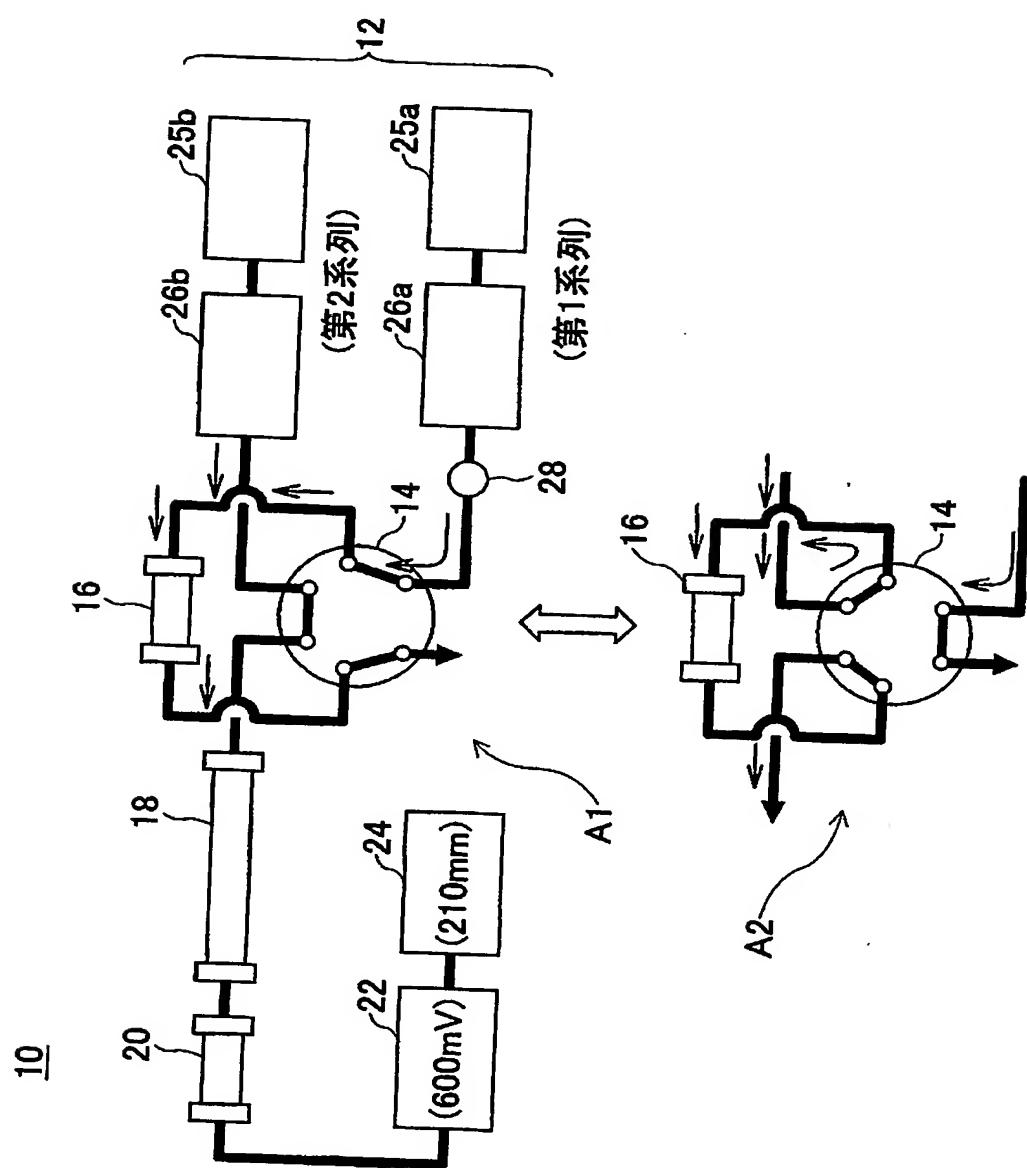
【図4】



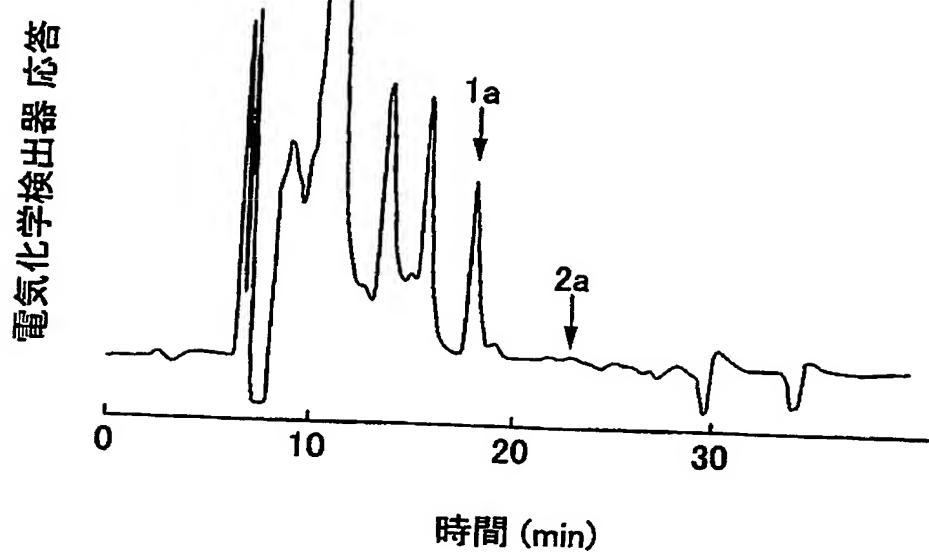
【図5】



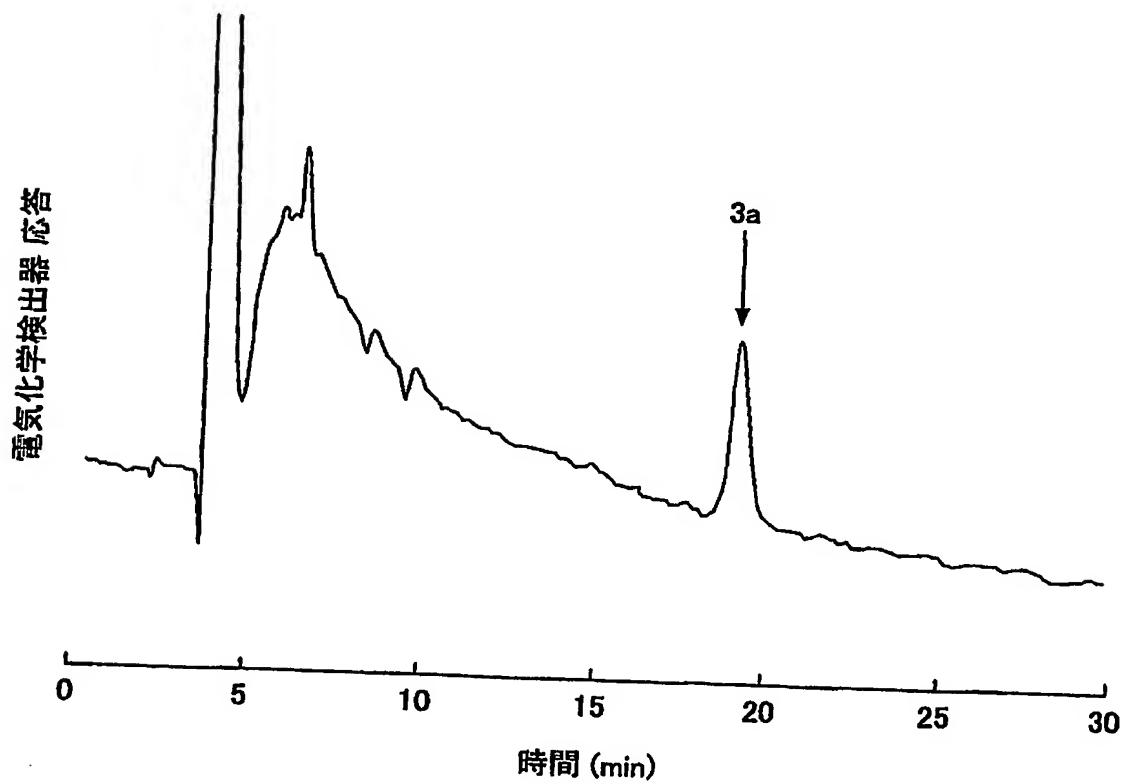
【図6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 検体中のコエンザイムQ-10とその2電子還元体の含有量を正確に分析することができる分析方法ならびに分析システムを提供する。

【解決手段】 前処理として、検体としてのヒトの血漿をイソプロピルアルコールと混合し、コエンザイムQ-10およびその2電子還元体をイソプロピルアルコールに抽出する。抽出液は分析するまでの間4℃の温度で保管する。抽出液を分析試料として、送液機構12、切り換え機構14、濃縮カラム16、分離カラム18、還元カラム20、紫外吸収検出器22および電気化学検出器24を備える分析システム10で分析する。

【選択図】 図6

出願人履歴情報

識別番号

[502437827]

1. 変更年月日

[変更理由]

2002年12月 3日

新規登録

住 所

東京都港区北青山3-5-4

氏 名

株式会社分子生理化学研究所

出願人履歴情報

識別番号

[000001959]

1. 変更年月日

[変更理由]

1990年 8月27日

新規登録

住 所

東京都中央区銀座7丁目5番5号

氏 名

株式会社資生堂